DOI:10.11931/guihaia.gxzw201803017

应用 BioID 技术筛选水稻 GS3 互作蛋白

杜荣裕， 周泽娇， 冯嘉琳， 刘赛， 阳辉勇， 李洪清*

（华南师范大学生命科学学院//广东省植物发育生物工程重点实验室，广东 广州 51631 ）

摘要：水稻异源三聚体 G 蛋白系统中的非典型γ亚基 *GS3*，是一个控制籽粒大小的主效数量效应基因座，在调节籽粒大小中发挥负调节子的功能，但是其直接相互作用的蛋白研究甚少，相关的机制尚未阐明。BioID (proximity-dependent biotin identification) 为邻近蛋白标记技术，其工作原理是：生物素连接酶能使其周围的蛋白带上生物素，同时生物素又能和链霉亲和素紧密结合，所以能够利用链霉亲和素偶联的磁珠富集目标蛋白。该技术具有灵敏、高效和周期短等特点，为筛选互作蛋白提供了新的方法。本文以水稻原生质体为材料，采用 BioID 技术对 GS3 在水稻中的互作蛋白进行了筛选。Western-blot 结果表明，融合蛋白 BirAG-GS3 在原生质体中成功表达并生物素化 GS3 邻近蛋白。使用链霉亲和素磁珠富集生物素化后的蛋白，并进行蛋白质谱测序，获得了与 GS3 邻近的可能存在直接或间接互作的蛋白。将获得的蛋白进行功能富集与注释，并构建蛋白-蛋白互作网络。对部分蛋白进行了 BiFC 验证，发现 GS3 可能与 ICL、PPDK、RPN7 和 RH15 发生相互作用，涉及能量代谢的调节、种子淀粉物质的储存、泛素-蛋白酶体系统，以及凋亡途径等生物过程。上述结果为解析 GS3 的蛋白调控网络奠定了基础。

关键词：BioID，GS3，水稻，增产，互作蛋白

中图分类号：　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

Screening of Interaction Proteins of GS3 in rice using BioID

Du Rongyu, Zhou ZeJiao，Feng Jialin，Liu Sai，Yang Huiyong，Li Hongqing*

（*Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development //School of Life Science*, Guangzhou 510631, Guangdong, China）

Abstract: *GS3*, encoding the noncanonical γ subunit of heterotrimeric G proteins system in rice, is a major quantitative trait locus for grain size in different rice varieties, serving as a negative regulator in seed or organ size. However, the mechanism of grain size regulated by GS3 is still largely unknown. The newly-developed BioID (proximity-dependent biotin identification) system, which detects proximal proteins *in vivo*, have been successfully applied in different species for its features of sensitivity, high efficiency and fast speed.And the mechanism of BioID is that the biotin ligase, the core component, could attach biotin to the proximal proteins, and the biotin also connects tightly with the streptavidin, and therefore the beads coupled streptavidin could be utilized for enriching the target proteins. In this paper,we screened proteins interact directly or

indirectly with GS3 in rice protoplasts by the BioID method. The results of Western-blot show that the fused protein BirAG-GS3 expressed and biotinylated the proximal proteins of GS3 in the protoplasts successfully. Biotinylated proteins has been enriched by beads coupled streptavidin and the Mass Spectrometry sequencing has been performed on it. Then， the function of proteins has been annotated and enriched, and meanwhile the protein-protein interaction graph has been established. Some of the candidate proteins were confirmed by BiFC, showing that the possible interaction between ICL, PPDK, RPN7 and RH15, and that the engagement of GS3 in regulation of energy metabolism, stock of starch, ubiquitin-proteasome system and apoptotic pathway . The above results will facilitate the elucidation of the regulation network of the function of GS3.
Key words: BioID，GS3，Rice，Grain size, Interaction proteins

基金项目：国家自然科学基金（31571759） [Supported by National Natural Science Foundation of China (31571759)] 。
作者简介：杜荣裕(1992-)，男 ，广东，硕士，主要从事水稻分子生物学研究， dury@m.scnu.edu.cn。
*通信作者：李洪清，博士，教授，主要从事水稻基因工程育种，hqli@scnu.edu.cn。

在动植物中，异源三聚体 G 蛋白由α、β和γ三个亚基组成，是非常重要的信号调节因子。在植物中，异源三聚体 G 蛋白的信号通路在生长发育与抗逆生理中起着不可替代的作用(Stateczny et al, 2016)。相比哺乳动物异源三聚体 G 蛋白信号网络，植物异源三聚体 G 蛋白家族成员的数量、结构，以及其上游受体，下游效应蛋白的成员组成，乃至整个 G 蛋白的循环机制都表现出非典型性(Trusov ＆ Botella, 2016)。并且，在植物中还没有统一的异源三聚体 G 蛋白网络模型，例如，在拟南芥中发现了一个类似哺乳动物的 7 次跨膜受体类似蛋白 AtRGS，但在水稻中没有找到 7 次跨膜同源受体蛋白。令人意外的是，水稻中发现了一个 11 次跨膜受体 COLD1，与异源三聚体 G 一起调节 Ca^{2+}通道，抵御严寒(Stateczny et al, 2016)。最新观点认为受体类激酶在 G 蛋白信号网络中起首要作用(Choudhury ＆ Pandey, 2016)。

异源三聚体 G 蛋白中的非典型γ亚基 GS3 在水稻谷粒大小调节中起着重要作用，在水稻增产方面展现巨大的潜力。非典型的γ亚基由 N 端一个保守的γ类结构域、预测的跨膜域和 C 端半胱氨酸富集结构域组成(Botella, 2012)。GS3 的γ类结构域负调节谷粒大小，而其 C 端的尾部又反过来抑制 N 端的功能。这导致 GS3 蛋白的头尾出现了功能上的“博弈”。GS3 头部功能越强，对谷粒长度抑制越明显。当 GS3 的γ类结构域突变或者缺失，不能与β亚基形成二聚体发挥作用，谷粒最长；完整的 GS3 蛋白尾部抑制γ类结构域的负调控功能，减弱基因效应，粒长中等；当只有γ类结构域，基因所起的抑制效应最强，粒长最短(Mao et al, 2010)。

BioID（proximity-dependent biotin identification）为邻近蛋白标记技术，该方法可以将物理空间上靠近诱饵蛋白附近的蛋白标记上生物素，用以作为蛋白质互作的证据。该技术的核心功能组件是生物素连接酶。在大肠杆菌中，生物素连接酶 BirA 识别的底物具有特异性，其作用的蛋白包含一段特定的氨基酸序列，并将其生物素化。如果将 BirA 的 118 位进行突变(R118G, BirA*)，会极大降低其识别底物的特异性，其作用的蛋白不需要带有特定的氨基酸也能被生物素化(Kwon and Beckett, 2000)。BioID 最早应用于哺乳动物细胞中(Roux et al,

2012)。除了应用于动物细胞中，BioID 技术也可用单细胞生物，例如布氏锥充（*Trypanosoma brucei*）、刚地弓形虫（*Toxoplasma gondii*）、盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）。也可用于宿主-病原体系统的研究，例如 HIV-1 互作蛋白的研究(Varnaite and MacNeill, 2016)。本实验室以水稻原生质体为材料，通过研究影响 BioID 在植物中应用的多种因素，建立了适合在水稻中使用 BioID 系统 (Lin et al, 2017)。

BioID 技术的操作流程主要包括：1. 构建带有融合蛋白 BirAG 的目的蛋白表达载体，并转化植物原生质体，瞬时表达融合 BirAG 的目的蛋白；2. 在有生物素的条件下进行孵育，使目的蛋白领近的其他蛋白被生物素化；3. 提取原生质体总蛋白与链霉亲和素磁珠进行共孵育，被生物素化的蛋白即可吸附在磁珠上；4.通过清洗、洗脱等步骤获得富集的生物素化蛋白，利用 western-blot 以及质谱分析的方法，可以对被生物素化的蛋白进行鉴定(Lin et al, 2017)。研究认为，在诱饵蛋白附近 10nm 范围内的蛋白，包括直接、间接相互作用的都会被生物素化而被鉴定出来(Varnaite and MacNeill, 2016)。

GS3 调控种子大小的功能已经非常明确，但是关于 GS3 调控机制的研究比较少见。本论文采用 BioID 方法，一种不同于现有的酵母双杂交的方式，筛选 GS3 互作蛋白，为 GS3 相关调控网络的研究提供新的思路。

1. 材料与方法

1.1 材料

水稻“中花 11”（*Oryza sativa* L.）由本实验室保存。KOD FX 聚合酶购自东洋纺（上海）生物科技有限公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 生物有限公司。质粒抽提试剂盒为 Axygen 公司产品。大肠杆菌感受态菌株 JM109 为本实验室保存。BioID 载体由本实验室保存(Lin et al, 2017)。引物合成由上海生工生物技术有限公司完成。所用链霉亲和素磁珠由 Solulink 公司提供。抗 BirA 兔源多抗为 LifeSpan BioSciences 公司生产。二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体，由 Proteintech 公司生产。RIPA 强蛋白提取液、辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素为碧云天公司生产。测序由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。蛋白质谱测序由深圳市微纳菲生物技术有限公司进行。

1.2 方法

1.2.1 构建水稻 *GS3* BioID 载体

提取水稻 RNA 并反转录成 cDNA，运用 PCR 技术对 *GS3* CDS 进行扩增。所用引物为 GS-F：GA<u>AGATCT</u>ATGGCAATGGCGGCGGCGCCCCGGCC；GS-R：GG<u>ACTAGT</u>TCACAAGCAGGGGGGGCAGCAACGAGGGAC。下划线标记的序列为引入的 *Bgl*Ⅱ和 *Spe*Ⅰ的酶切位点。退火温度为 60℃，延伸 1min，35 个循环，回收 PCR 产物，进行酶切与纯化。

BioID 的载体图 1 所示，用 BamHⅠ和 SpeⅠ 进行双酶切，变性，并与获得的 *GS3* 纯化进行连接，转化大肠杆菌，提取阳性菌株质粒，测序。

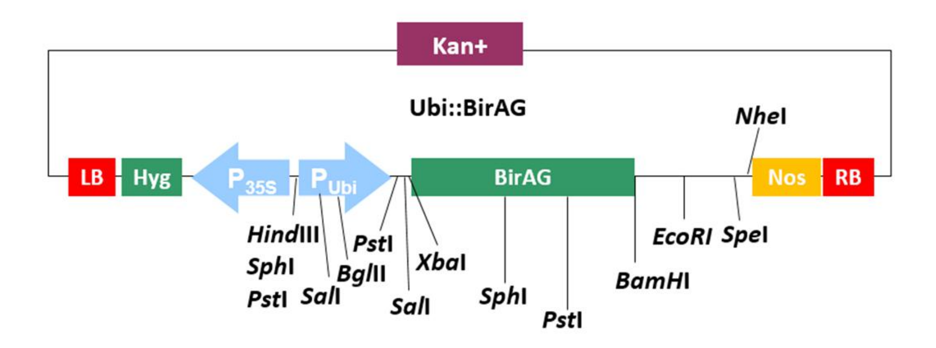


图 1 *pUbi::BirAG* 载体图谱

Fig.1 Physical map of *pUbi::BirAG* vector

1.2.2 水稻原生质体的转化

原生质体的转化参照 Yang 等人(2014)的方法，将 *pUbi::BirAG::GS3* 转化进 400μL 水稻原生质体中（原生质体浓度约为 2×10^6 个·L^{-1}），同时转入 *pUbi::BirAG* 作为阳性对照。最后在培养液中加入外源生物素（终浓度为 50μmol·L^{-1}）培养 24h。同理，再转化一组 *pUbi::BirAG::GS3*，以不加入生物素一组为阴性对照。

1.2.3 蛋白质的提取与鉴定

1）原生质体培养 24h 后，用 3000r·min-1，3min 收集原生质体；用 0.6M 甘露醇洗涤原生质体，再次收集原生质体；加入 700ml RIPA 强蛋白提取液，剧烈震荡，13000r·min-1 在 4℃下离心 20min，取上清，于－20℃储存备用。

2）取 15μL 的蛋白样品在 12%SDS-PAGE 上分离后，用湿法转膜法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上。 电转完毕后，使用抗 BirA 兔源多抗做一抗，辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体作为二抗，进行 Western-blot 进行分析，观察 BirAG 蛋白表达结果。同理，用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素作为抗体，检测标记上生物素的蛋白。

1.2.4 生物素化蛋白质的富集

1）磁珠处理：涡旋震荡原始磁珠瓶 1min，利于成团的磁珠分散；取 20μL 磁珠于 EP 管中；磁力架上放置 2min，去上清；加入 RIPA 强 1mL，震荡分散磁珠，室温摇摆 5min；重复以上清洗步骤 2 次；磁珠与蛋白样品孵育 4℃过夜；2% SDS 清洗 1 次，RIPA 清洗 2 次磁珠，将磁珠样品悬浮在 PBS 缓冲液，送往公司进行蛋白质谱测序。

2）蛋白质谱测序

参照 Wisniewski 等人（2009）的方法，采用胰的蛋白酶处理富集生物素化蛋白的磁珠，将其制成多肽溶液进行 LC-MS/MS 分析（质谱仪型号为 Triple TOF 5600 LCMS(AB SCIEX)）。采用 Maxquant 软件进行数据加工处理和检索分析，数据库为 Uniprot 下物种为 Oryza sativa subsp.japonica 蛋白数据库，检索参数设置如下：半胱氨酸烷基化为碘乙酰胺、可变修饰为甲硫氨酸氧化和蛋白 N 端乙酰化、胰蛋白酶酶解，二级质谱匹配容差为 40ppm，多肽假阳性率控制为 1% FDR，蛋白假阳性率控制为 1%。

1.2.5 BiFC 验证互作蛋白

挑选相关的功能基因进行克隆，构建 BiFC 载体。进行原生质体转化，12h 后于 LSM 800 激光共聚焦显微镜下观察荧光。

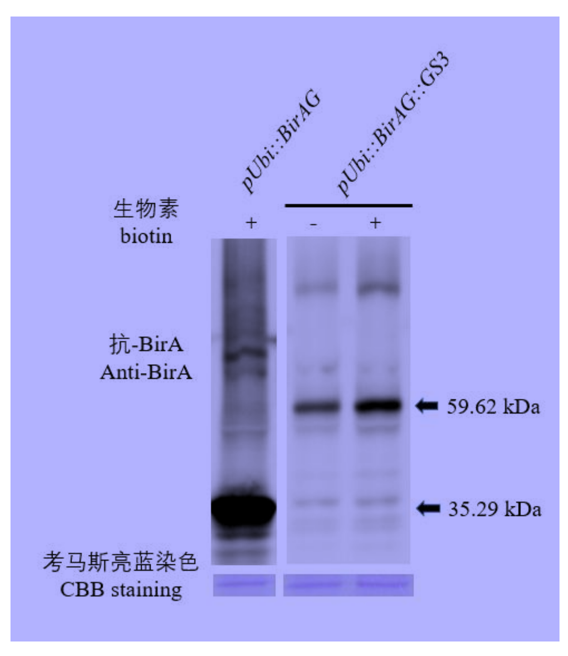
所用载体为 pSAT6-cEYFP-C1-B-(3108)和 pSAT6-nEYFP-C1-(E2884)。
所用到的引物如下（下划线标出酶切位点，并标注对应的内切酶）：

ICL- F：GAAGATCTATGTCGTCGCCGTTCTCCGTGCCATCT（Bgl II）
ICL- R：CGGAATTCCATCCTGGATTTGGCAAGAACATGGCT（EcoR I）
PPDK1-F：GAAGATCTATGCCGTCGGTTTCGAGGGCCGTGTGC（Bgl II）
PPDK1-R：GCTCTAGAGAGGAGCACCTGAGCTGCAGCTAGCCT（Xba I）
RPN7-F：GAAGATCTATGGACGGCGGCGTAGGCGAGGAAGGG（BglII）
RPN7-R：CGGAATTCCAGGTCAATGACTCGTGATAGCTTCTG（EcoR I）
RHD3-F：GAAGATCTATGGACGCCTGTTTTCAACACAGCTT（Bgl II）
RHD3-R：CGGAATTCGTGTGCAATCGGGCTTGAATATTCGGGT（EcoR I）
RH15-F： CGAGCTCAAAATGGGCGAAGCTGAGGTCAAGGACAAC（Sca I）
RH15-R： GCAGTACTCGAAGGCATATATGTCGAAGTATCAAT（Xba I）

2. 结果与分析

2.1 BirAG-GS3 蛋白在水稻原生质体中的蛋白质表达

将 *pUbi::BirAG* 质粒转化进原生质体中，加入生物素进行培养，作为阳性对照；将 *pUbi::BirAG::GS3* 质粒转化两份原生质体，一份添加生物素，一份不添加，分别作为实验组和阴性对照组。孵育 24 小时后，提取原生质体总蛋白，使用兔抗 BirA 多克隆抗体为一抗进行 western-blot 检测，其中 BirAG 预测大小为 35.29 kDa，BirAG-GS3 融合蛋白预测大小约为 59.62 kDa，与实验结果相符。实验结果如图 2 所示，表明 BirAG-GS3 融合蛋白成功表达。



注：原生质体转化后，在含有生物素（+）或不含生物素（-）培养液孵育后，使用 Anti-BirA 抗体对其总蛋白进行 Western-blot，检测 BirAG 是否表达成功。考马斯亮蓝 G-250 染色用于蛋白载样量监测。

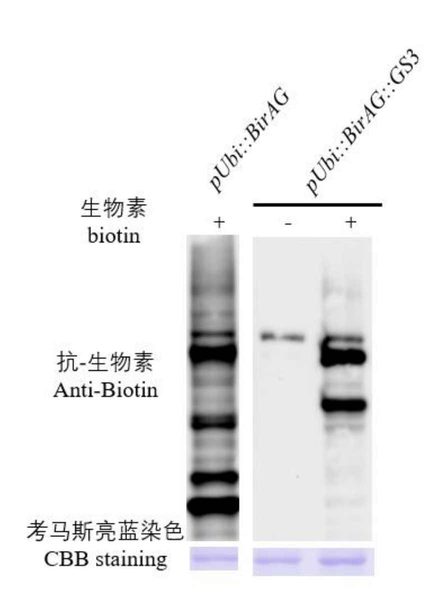
Note： Western-blot of proteins in rice protoplasts after transient expression of BirA and BirA-GS3, with or without biotin in protoplasts incubation solution. Anti-BirA antibody were used for detection of BirAG. Coomassie Brilliant Blue G250 staining was used for monitoring the sample loading amount.

图 2 BirAG 和 BirAG-GS3 在原生质体中的蛋白表达情况

Fig.2 Expression of protein of BirAG and BirAG-GS3 in rice protoplasts

2.2 GS3 邻近蛋白在水稻原生质体中的生物素化情况

取 3 组蛋白样品，以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素进行 western-blot 检测（图 3）。Western-blot 结果显示，阳性对照的 BirAG 组出现多条条带，表示其能够生物素化多种水稻中的蛋白。BirAG-GS3 在没有添加生物素的情况下，只出现一条条带，该条带为水稻内源生物素化的蛋白。说明在没有添加生物素的培养液中，BirAG-GS3 蛋白成功表达但是没有对周围蛋白进行生物素化。BirAG-GS3 在添加生物素的培养液中，条带数增加，并且出现了特有的条带，说明 BirAG-GS3 可以使得邻近蛋白的生物素化。该结果表明， BirAG-GS3 融合蛋白成功生物素化直接或者间接相互作用的蛋白。



注：原生质体转化后，在含有生物素（+）或不含生物素（-）培养液孵育后，使用链霉亲和素-HRP 对其总蛋白进行 Western-blot，检测生物素化蛋白情况。

考马斯亮蓝 G-250 染色用于蛋白载样量监测。

Note： Western-blot of proteins in rice protoplasts after transient expression of BirAG and BirAG-GS3, with or without biotin in protoplasts incubation solution. Streptavidin-HRP antibody were used for detection of biotinylated proteins in rice. Coomassie Brilliant Blue G250 staining was used for monitoring the sample loading amount.

图 3 BirAG 和 BirAG-GS3 融合蛋白在原生质体中的生物素化情况

Fig.3 Proteins biotinylated by BirAG and BirAG-GS3 in rice protoplasts

2.3 GS3 邻近蛋白的质谱鉴定结果

各组的生物素化蛋白经过磁珠富集后进行，经过酶切等后续处理，然后进行 LC-MS/MS 分析。质谱采集到的原始 wiff 图谱文件，采用 Maxquant 软件进行数据加工处理和检索分析，将获得的蛋白制成韦恩图（如图 4 所示）。经过 BirAG 组和 GS3（-）组的过滤，我们发现实验组 GS3（+）特有的蛋白有 101 个，将这些蛋白导入网站 https://www.ebi.ac.uk/QuickGO，

进行基因本体注释（如图 5）。结果显示 GS3 邻近蛋白参与多个生物学功能，例如多种氮类化合物、氨基酸和多肽等的代谢过程。细胞组分方面，GS3 邻近蛋白主要集中在细胞质中，在叶绿体中也有富集。分子功能方面，GS3 相关蛋白主要有结构分子活性，同时依赖小分子来调节功能，例如结合各类核苷酸、阴离子等。按照其分子功能，我们将得到的蛋白进行分类，如表 1 所示。将这些蛋白导入 STRING 网站 (http://string-db.org，互作蛋白/基因检索工具)，构建 GS3 邻近蛋白质互作网络（图 5）。实验表明，GS3 邻近的蛋白之间也存在许多实验证明的或者计算机预测的相互作用。同时可以看出，GS3 邻近蛋白在核糖体、卟啉和叶绿素代谢，脂肪酸伸长，乙醛酸和二羧酸代谢，光合作用等途径发生富集。

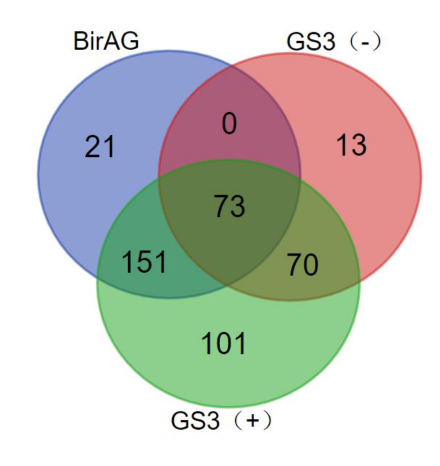


图 4　质谱鉴定蛋白韦恩图

Fig.4 Schematic Venn diagram of the proteins identified by MS

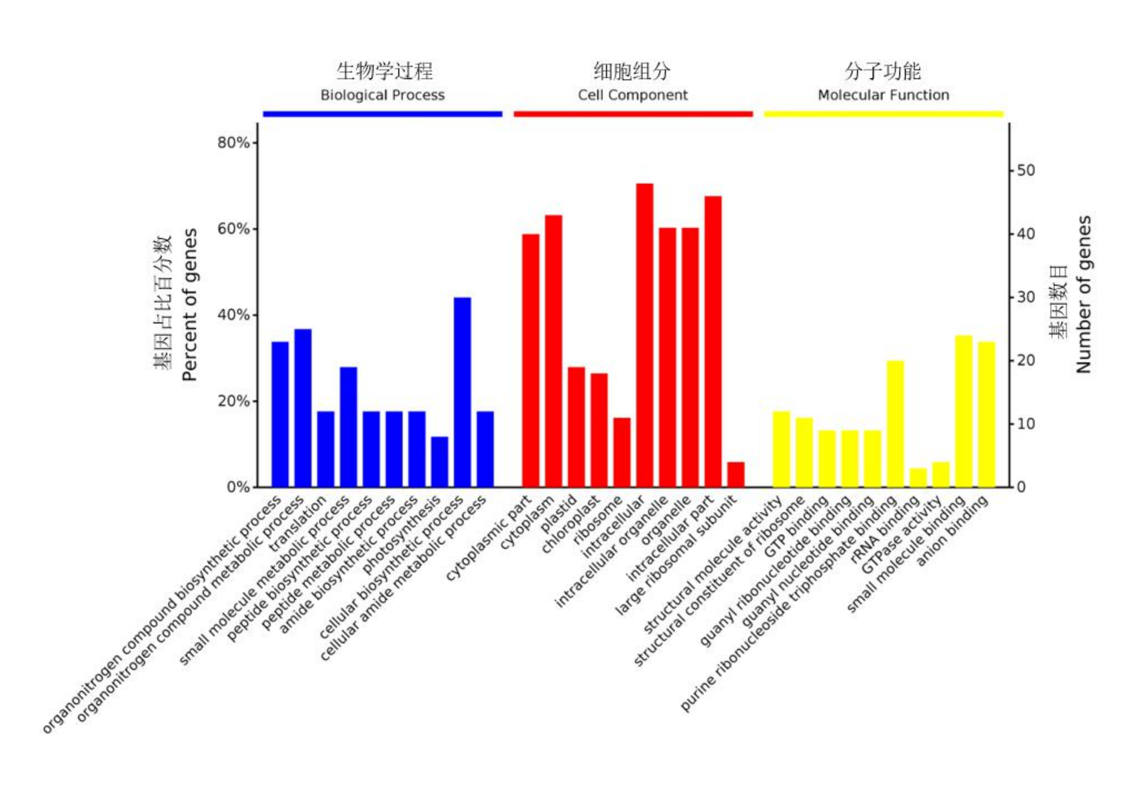


图 5 基因本体富集

Fig.5 Enriched Gene Ontology

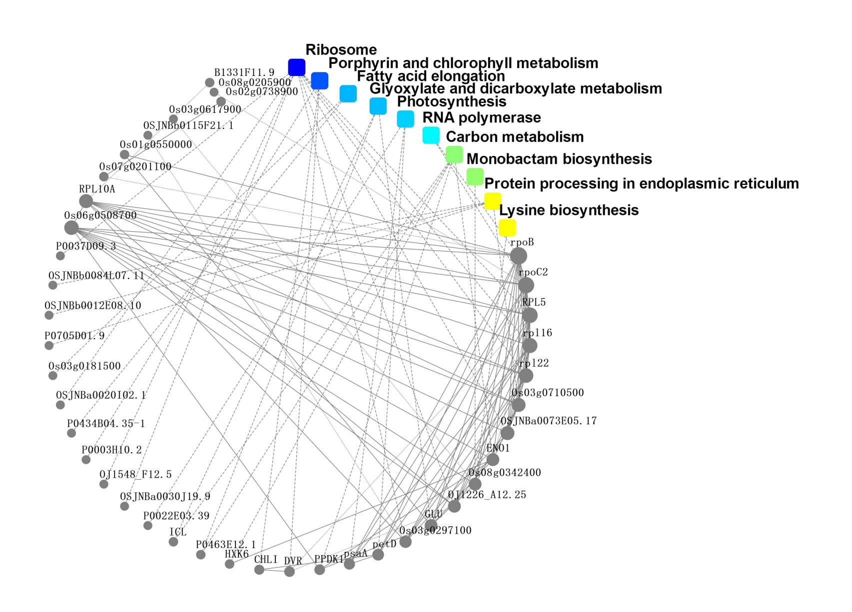


图 6 蛋白-蛋白互作网络

Fig.6 The protein-protein interaction graph

注：圆圈代表基因/蛋白，方框代表 KEGG 通路或者生物过程。颜色由黄色到蓝色逐渐加深，颜色越深，代表 P-value 值越大。

Note: Circle nodes for genes/proteins, rectangle for KEGG pathway or biological process. Pathway were colored with gradient color from yellow to blue, yellow for smaller P-value, blue for bigger P-value. The full lines mean known interactions, while the dotted line means predicted ones.

表 1 蛋白质谱结果

Table 1 Results of Protein spectrum sequencing

名称 Name	UniProt 登录号 Uniprot Accession
结构分子活性 Structural molecule activity	Q67W51 Q9ZST0 Q7XVZ0 P0C443 Q6YSX0 Q84MQ4 Q6Z382 B7F845 Q60E59 Q10MS5 P0C446 Q6K853
GTP/ATP 结合 GTP/ATP binding	Q6YW27 Q0JLS6 (RHD3) Q0DXR0 Q6ATR5 Q10PB3 Q9SDK4 P40393 Q654U5 Q40723
嘌呤核糖核苷三磷酸绑定 Purine ribonucleoside triphosphate binding	Q53RJ5 Q75HJ3 Q84ZB2 Q5JK84（RH15） Q8LQ68 Q75HT8 Q7XPY2 Q9ZTS1 Q6AVA8（PPDK1） Q53RM0 Q6K4Q0
小分子结合 Small molecule binding	Q6AV34 Q7F2X8 P0C503 Q0J6A9

阴离子结合 Anion binding	Q6ZCF0 Q67VZ1
氧化还原酶 Oxidoreductase activity	Q5ZED1 P0434B04.35-1 Q10LH0
谷氨酸合成酶活性 Glutamate synthase activity	Q69RJ0
环孢菌素 Cyclosporin A binding	Q651B0
镁-原卟啉 IX 单酯环化酶活性 Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl estercyclase activity	Q9SDJ2
变构酶活性 Epimerase activity	Q6EPQ1
叶绿素 II 结合 Chlorophyll binding	P0C355 Q84PB5
异柠檬酸裂解酶活性 Isocitrate lyase activity	Q6Z6M4（ICL）
异构酶活性 Isomerase activity	Q5Z9H9
电子转运载体 Electron transporter	P0C319
磷酸丙酮酸水合酶 Phosphopyruvate hydratase	Q42971
离子结合 Ion binding	Q6ZH84 Q6AT26 Q7XV86 Q6K669
核酮糖-二磷酸羧化酶 ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Q67IU5
结合 Binding	Q5W6J3 Q0JL44 SGT1 Q657C0
其他分子功能 Other Molecular Function	Q10QW1 Q0IPL3 Q9LGQ6

未知 Unknown	A0A0N7KL37 A0A0P0W2R2 P0C509 Q6ETD9 A0A0P0XC87 Q5VS79 A0A0P0VLT9 A0A0N7KJP5 A0A0N7KKN1 A0A0P0XX95 A0A0P0W7K8 A0A0P0XBM6 P55857 A0A0P0W399 A0A0P0WJQ6 Q6H660 Q94D81 A0A0P0VWW1 Q658I5 Q84SZ1 A0A0P0XWA7 A0A0P0VUM8 A0A0N7KLS7 C6L686 A0A0P0W2P0 A0A0P0W2P0 Q9FTY4 P0436E04.19 A0A0P0VRQ0 A0A0P0VRQ0 Q6Z4F3 OSJNBb0084L07.11 A0A0N7KKB7 A0A0N7KKB7 A0A0N7KMS0 A0A0N7KMS0 A0A0P0YAA5 A0A0P0YAA5 Q6Z901 P0501G04.4 Q8W425（RPN7） Q6K6G8 P0487H05.39 Q84R32 OSJNBb0016H12.19 A0A0P0VUN0 A0A0P0VUN0 Q8H080 OSJNBb0050N02.11 A0A0P0Y344 A0A0P0Y344 A0A0P0VVX9 A0A0P0VVX9

注：用于 BiFC 实验的 5 个蛋白编号在表 2 中已经备注，并用方框标记。

Note： The Uniprot Accessions of 5 proteins for BiFC are framed and noted.

2.4 GS3 与其邻近蛋白互作的检测

为了对 BioID 鉴定的互作蛋白进行验证，我们通过双分子荧光互补技术，对过滤后的蛋白进行互作验证。我们挑选了 ICL(Isocitrate lyase, 异柠檬酸盐裂解酶)、PPDK1 (Pyruvate phosphate dikinase 1，丙酮酸磷酸双激酶)、RPN7(26S 蛋白酶体的非 ATP 酶的调节亚基 6，26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6)、 RH15(DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15，DEAD 盒 ATP 依赖的 RNA 解旋酶 15)和 RHD3(ROOT HAIR DEFECTIVE 3，根毛缺陷蛋白 3)。5 个蛋白编号在表 2 中已经备注，并用方框标记。扩增这五个基因的 CDS，并构建 BiFC 表达载体。

BiFC 结果如图，显示 ICL、PPDK、RPN7 和 RH15 与 GS3 蛋白发生互作。

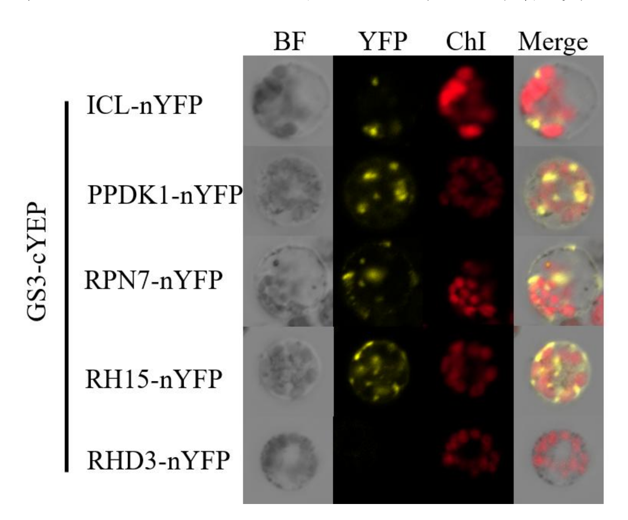


图 7 BiFC 验证 5 个新鉴定的与 GS3 互作的蛋白

Fig.7 Representative BiFC results of six proteins proximal to GS3 in rice protoplasts

3 结论与讨论

通过 BioID，我们成功得到了 101 个候选蛋白，我们挑选了 5 个进行 BiFC 初步验证，鉴定到了 4 个可能与 GS3 互作的蛋白，分别为 ICL、PPDK、RPN7 和 RH15，这些蛋白涉及多个植物生长生理过程。作为一种快速筛选可能的互作蛋白的方法，BioID 不同于酵母双杂交，它可以在或细胞中检测到临近蛋白，同时可以检测瞬时或弱结合蛋白。

ICL 和 MS（苹果酸合酶，Malate synthase）是乙醛酸循环中起关键作用的限速酶。油料种子通过乙醛酸循环，将脂肪转化为糖，这对种子的萌发、萌发后的生长有着重要的意义。水稻种子的主要成分是淀粉，所以水稻种子的乙醛酸循环可能参与其他生理反应。在缺氧环境下，植物的呼吸作用受到抑制或阻碍，于是通过乙醇发酵途径产生 NAD+。乙醇发酵途径能产生许多毒性物质，例如乙醛。正常有生长情况下，ICL 和 MS 几乎检测不到，而在水淹条件下迅速上升(Lui et al, 2005)。该结果预示 GS3 可能参与逆境生理。

PPDK1 催化丙酮酸和 PEP（Phosphoenolpyruvate，磷酸烯醇式丙酮酸）之间的可逆反应。其中，丙酮酸为氨基酸和脂肪酸的合成提供碳骨架。PEP 经过羧化反应后形成 OAA（α酮戊二酸）进入三羧酸循环，也能进入糖异生途径，另外，PEP 也能与 4-磷酸赤藓糖反应形成莽草酸，莽草酸参与木质素、生物碱合成，同时也是次生代谢中的重要物种。水稻中， PPDK1 基因在叶肉细胞中表达量不高，但是在籽粒中却大量表达(Kang et al, 2005)。研究指出 PPDK1 是在水稻种子发育过程中而不是在种子发育成熟后发挥功能，其主要通过磷酸化来调控其活性，同时蛋白质降解途径也参与其中(Chastain et al, 2006)。PPDK1 的表达量或者活性降低，会导致籽粒垩白度增加，粒重减轻(Kang et al, 2005; Wang et al, 2015)。研究发现，在玉米中 PPDK1 基因通过调控糖酵解通路，影响胚乳的品质(Lappe et al, 2018)。由此我们也推测，GS3 参与调控胚乳糖代谢途径。

依赖 ATP 提供的能量，DEAD-box RNA 解旋酶（RNA helicases，RHs）几乎参与 RNA 转录到衰变的所有生物过程，在植物的生长发育、抗逆反应中起重要作用(Linder & Fuller-Pace 2015)。在水稻中，凋亡抑蛋白 5（Apoptos isinhibitor5，API5）与 AIP1 (API5-INTERACTING PROTEIN1)和 AIP2 (API5-INTERACTING PROTEIN2)形成一个转录复合物，诱导半胱氨酸蛋白酶 1（Cysteine Protease 1，CP1）的表达。“API5-AIP1/2-CP1”调控水稻绒毡层降解过程中的细胞凋亡进程(Li et al, 2011)。其中，AIP1 与 AIP2 实质上是 ATP 依赖的 DEAD-box RNA 解旋酶成员,分别为 OsRH56 与 OsRH15。在拟南芥中，三聚体 G 蛋白的β亚基下游信号网络中，发现包括 DEAD-box 蛋白在内的 DNA/RNA 解旋酶参与其中(Khatri et al, 2017)。水稻中，Gα亚基参与参与 GA 通路，其突变体 dl 发生矮化，而 OsRH2 and OsRH34 双突变体表现出类似的表型，暗示 DEAD-box 解旋酶也可能参与 G 蛋白介导的 GA 信号通路(Huang et al, 2016)。所以，我们猜想 AIP2 也有可能参与到 GS3 下游网络调控。

泛素-蛋白酶体降解系统（(ubiquitin-proteasome system，UPS)）选择性地降解蛋白质，维持类蛋白质的平衡，由此参与到植物的生长发育与抗逆生理中。26S 蛋白酶体由 1 个 20S 核心颗粒（CP）和 2 个 19S 调节颗粒（RP）组成。RPN7 是构成 19S 颗粒装配的必要亚基，作为盖子的组成部分(Collins and Goldberg, 2017)。在 G 蛋白信号网络中，可以发现 26S 蛋白酶体参与其中。XLG2 直接与 FLS2 和 BIK1 相互作用，并且它与 AGB1 和 AGG1/2 的功能一起减弱蛋白酶介导的对 BIK1 的降解，使其达到最佳的免疫激活(Liang et al, 2016)。所以我们推测，GS3 可能也可以参与到泛素-蛋白酶体降解系统，进而传递信号。在酿酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）中，发现泛素连接酶 SCF^{Ucc1} 作为代谢开关，调节乙醛酸循环(Nakatsukasa et al, 2015)。结合 PPDK1 与 ICL 生物学功能，我们猜测 GS3 直接参与糖酵解、TCA 与乙醛酸循环的调节。

本论文通过 BioID 技术，成功捕获了 GS3 的邻近蛋白，并构建了这些蛋白的互作网络。

BiFC 实验表明，在选取的 5 个 GS3 邻近的蛋白中，有 4 个蛋白与之互作，分别为 ICL、PPDK、RPN7 和 RH15，涉及了能量代谢的调节、种子淀粉物质的储存、泛素-蛋白酶体系统，以及凋亡途径等生物过程，为构建植物异源三聚体 G 蛋白网路提供了线索，也为水稻的增产提供了新思路。由于本论文实验系统采用的是水稻叶肉原生质体，捕获的蛋白可能具有局限性。我们正在探索以整株转基因植物为材料进行 BioID 技术，以便能在不同的组织、细胞类型中更全面地筛选目标蛋白的互作蛋白。

参考文献：

BOTELLA JR, 2012. Can heterotrimeric G proteins help to feed the world? [J]. Trends Plant Sci, 17(10): 563-568.

CHASTAIN CJ, HECK JW, COLQUHOUN TA, et al, 2006. Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (Oryza sativa) seeds[J]. Planta, 224(4): 924-934.

CHOUDHURY SR, PANDEY S, 2016. Interaction of Heterotrimeric G-Protein Components with Receptor-like Kinases in Plants: An Alternative to the Established Signaling Paradigm? [J]. Mol Plant, 9(8): 1093-1095.

COLLINS GA, GOLDBERG AL, 2017. The Logic of the 26S Proteasome[J]. Cell, 169(5): 792-806.

HUANG CK, SIE YS, CHEN YF, et al, 2016. Two highly similar DEAD box proteins, OsRH2 and OsRH34, homologous to eukaryotic initiation factor 4AIII, play roles of the exon junction complex in regulating growth and development in rice[J]. J Plant Biol, 16.

KANG H G, PARK S, MATSUOKA M, et al, 2005. White-core endosperm floury endosperm-4 in rice is generated by knockout mutations in the C-4-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (OsPPDKB)[J]. Plant J, 42(6): 901-911.

KHATRI N, SINGH S, HAKIM N, et al, 2017. Comparative expression profiling of AtRAD5B and AtNDL1: Hints towards a role in G protein mediated signaling[J]. Gene Expression Patterns, 25-26: 167-174.

KWON K, BECKETT D, 2000. Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases[J]. Protein Sci, 9(8): 1530-1539.

LAPPE R R, BAIER J W, BOEHLEIN S K, et al, 2018. Functions of maize genes encoding pyruvate phosphate dikinase in developing endosperm[J]. Proc Nat Acad Sci Usa, 115(1): E24-E33.

LI X, GAO X, WEI Y, et al, 2011. Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 Coupled with Two DEAD-Box Adenosine 5 '-Triphosphate-Dependent RNA Helicases Regulates Tapetum Degeneration[J]. Plant Cell, 23(4): 1416-1434.

LIANG X, DING P, LIANG K, et al, 2016. Arabidopsis heterotrimeric G proteins regulate immunity by directly coupling to the FLS2 receptor[J]. Elife, 5.

LIN Q, ZHOU Z, LUO W, et al, 2017. Screening of Proximal and Interacting Proteins in Rice Protoplasts by Proximity-Dependent Biotinylation[J]. Front Plant Sci, 8.

LUI Y, WU Y R, HAN B, 2005. Anaerobic induction of isocitrate lyase and malate synthase in submerged rice seedlings indicates the important metabolic role of the glyoxylate cycle[J]. Acta Biochim Biophys Sinica, 37(6): 406-414.

MAO H L, SUN S Y, YAO J L, et al, 2010. Linking differential domain functions of the GS3

protein to natural variation of grain size in rice[J]. Proc Nat Acad Sci Usa, 107(45): 19579-19584.

NAKATSUKASA K, NISHIMURA T, BYRNE S D, et al. The Ubiquitin Ligase SCFUcc1 Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle[J]. Mol Cell, 2015, 59(1): 22-34.

ROUX K J, KIM D I, RAIDA M, et al, 2012. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells[J]. J Cell Biol, 196(6): 801-810.

STATECZNY D, OPPENHEIMER J, BOMMERT P, 2016. G protein signaling in plants: minus times minus equals plus[J]. Curr Opin Plant Biol, 34: 127-135.

TRUSOV Y, BOTELLA J R, 2016. Plant G-Proteins Come of Age: Breaking the Bond with Animal Models[J]. Front CHEM, 4.

VARNAITE R, MACNEILL S A, 2016. Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID[J]. Proteomics, 16(19): 2503-2518.

WANG HY, LOCKWOOD SK, HOELTZEL MF, et al, 1997. The ROOT HAIR DEFECTIVE3 gene encodes an evolutionarily conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in Arabidopsis[J]. Gene Develop, 11(6): 799-811.

WANG ZM, LI HX, LIU XF, et al, 2015. Reduction of pyruvate orthophosphate dikinase activity is associated with high temperature-induced chalkiness in rice grains[J]. Plant Physiol Biochem, 89: 76-84.

YANG JW, FU JX, LI J, et al, 2014. A Novel Co-immunoprecipitation Protocol Based on Protoplast Transient Gene Expression for Studying Protein-protein Interactions in Rice[J]. Plmol Biol Rep, 32(1): 153-161.